

09

CARACTERISTICAS Y PATOGENICIDAD DE *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows AGENTE CAUSAL DEL MARCHITAMIENTO BACTERIANO DE *Zornia* spp Y SU EFECTO EN EL RENDIMIENTO DE *Z. glabra* CIAT 7847 Y *Phaseolus vulgaris*

Alvaro Chavarro C.*

Cesar A. Lopez G.*

Jillian M. Lenne **

COMPENDIO

Por las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, se confirmó que el agente causal del marchitamiento bacteriano de *Zornia* spp es *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows. En invernadero, tres aislamientos de *Zornia* spp y uno de *P. vulgaris* causaron la enfermedad en *Zornia* y fríjol. Las masas del patógeno se localizaron en las células de los tejidos que forman la testa de la semilla del fríjol. En el campo, los aislamientos de *Zornia* spp produjeron clorosis, necrosis, atrofia, marchitamiento y muerte; el patógeno afectó el 52.5 y 88.8 o/o de las semillas de fríjol y *Zornia* y el coeficiente de correlación entre la infección bacteriana y germinación fue de -0.87.

ABSTRACT

It was confirmed that the causal agent of bacterial wilt of *Zornia* spp is *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows, by morphological, physiological and biochemical characters. In the glasshouse, three isolates from *Zornia* spp and one isolate from *P. vulgaris* were shown to be pathogenic and causal agents of the disease in both *Zornia* and beans. In beans seeds, masses of the pathogen infecting cells of the tissues that form the testa were localized. In the field, the isolates of *Zornia* spp produced chlorosis, necrosis, atrophy, wilting and death; the pathogen affected 52.5 o/o and 88.8 o/o of seed of beans and *Zornia* and the correlation coefficient between bacterial seed infection and germination was - 0.87.

* Estudiante de pre-grado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira

** Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT. AA. 6713, Cali, Colombia

1. INTRODUCCION

En las regiones de suelos ácidos e infértiles de América Tropical el factor que más limita la producción animal ha sido la falta de pasturas de alto rendimiento y calidad, adaptadas a las difíciles condiciones edáficas y bióticas y que puedan proporcionar a los rumiantes durante el año una dieta energética-proteínica balanceada (CIAT, 2 y 3).

Zornia glabra, leguminosa forrajera promisoría para las sabanas de los trópicos, tiene buena adaptación a los suelos ácidos bajos en fósforo, potasio y magnesio y altos de aluminio. Además, su producción de materia orgánica digerible y el contenido de fósforo es mayor que el de otras leguminosas de alto valor nutritivo (*Stylosanthes*, *Desmodium* y *Aeschimenne*).

Sin embargo, en Colombia en 1981, *Z. glabra* presentó síntomas de una enfermedad llamada marchitamiento bacteriano, causada por *Corynebacterium flaccumfaciens*, que produjo clorosis, atrofia, marchitamiento y en casos extremos necrosis y muerte de la planta (Torres, Lenné y Victoria, 9). Aunque no se ha registrado aún en América Latina el ataque a fríjol, ya se ha diseminado a nivel mundial (Suráfrica, Australia, Bélgica, Bulgaria, Francia, Alemania, Nueva Zelanda y Estados Unidos) y ha causado grandes pérdidas en la producción.

Basados en lo anterior, este trabajo tiene como objetivos comparar las características de los aislamientos de *C. flaccumfaciens* obtenidos a partir de *Zornia* spp. con los de *Phaseolus vulgaris*; estudiar la patogenicidad de los aislamientos en el invernadero y campo; determinar la transmisión de la bacteria por semillas y su incidencia en la germinación; ubicar la posición de la bacteria en la semilla y evaluar el efecto de la enfermedad sobre los rendimientos de *Z. glabra* CIAT 7847 y de tres variedades de *P. vulgaris*.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1. Estudios de laboratorio.

En el trabajo, realizado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, se utilizaron los aislamientos I 603, I 607 e I 614 (procedentes de *Z. glabra* CIAT 7847) e I 615 (obtenido de *Phaseolus vulgaris* en los Estados Unidos e identificado por el American Type Culture Collection) clasificados como *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dowson.

Se compararon las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de los aislamientos obtenidos de *Z. glabra* CIAT 7847 con las de la cepa I 615. A los aislamientos, cultivados en agar nutriente (AN), se les determinaron forma, color, elevación, margen y consistencia; también se evaluaron la pigmentación en cloruro de tetrazolio (T Z C), la coloración en YDC (levadura, dextrosa, carbonato de calcio, agar) y se practicó la tinción de Gram con la modificación de Hucker (8). Se efectuaron las pruebas de oxidasa, producción de pigmentos fluorescentes en el medio B. de King, hidrólisis de almidón, requerimiento de oxígeno, catalasa y utilización de ramnosa.

2.2. Estudios de invernadero.

Para las pruebas de patogenicidad se realizaron inoculaciones cruzadas, inyectando el tallo principal de *Z. glabra* CIAT 7847 (susceptible a la enfermedad), de *Z. brasiliensis* CIAT 7845 y *Z. latifolia* CIAT 728 (leguminosas promisorias), de las variedades de fríjol PI 136677, PI 165078, PI 204600 (resistentes en Estados Unidos), de las variedades Porrillo Sintético, ICA Pijao y Bat 41 (susceptibles a *Pseudomonas*) y de ICA Guali (susceptible a diversas enfermedades bacterianas). El ensayo se diseñó completamente al azar con 7 ecotipos de fríjol y 3 de Zornia; 4 aislamientos bacterianos y un testigo (agua), para 50 tratamientos con 4 repeticiones y 600 plantas. Las plantas se clasificaron en sanas (-), con pocas manchas (+), con cuatro a cinco manchas pequeñas o una mediana(++), con una mancha grande(+++), con varias manchas grandes o con varias hojas marchitas(+++++) y muertas(+++++).

Para determinar la localización de *C. flaccumfaciens* los tejidos de la semilla y las células de la bacteria se fijaron con una solución de alcohol, formol y ácido acético durante 48 horas. Luego se deshidrataron con alcoholes de diferentes grados, se aclararon con xilol e impregnaron con parafina por 12 horas. La tinción de los cortes se realizó por el método de Brown y Brenn (1).

2.3. Estudios de campo.

Se estudió el efecto de los aislamientos de *C. flaccumfaciens* sobre la incidencia de la enfermedad y el rendimiento (semilla y materia seca) de tres variedades de *P. vulgaris* (PI 136677, Porrillo Sintético y PI 204600) y el rendimiento (materia seca) de *Z. glabra* CIAT 7847. Las plantas se inocularon con I 603 (seleccionado al azar), con una mezcla de I 603, I 607 e I 614 y con agua (testigo). El ensayo se ajustó a un diseño de parcelas divididas con 12 tratamientos y 4 repeticiones.

Para determinar la transmisión de la bacteria y el efecto sobre la germinación se colocaron semillas desinfectadas (hipoclorito de sodio al 10/0 durante 1 minuto) en agar nutriente (tratamiento 1) y a pre-germinar a temperatura ambiente (tratamiento 2).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Estudios de laboratorio.

En agar nutriente e incubados durante 36 horas a 28°C, todos los aislamientos eran circulares, convexos, color crema con halo brillante, enteros y butirosos (Cuadro 1).

El crecimiento de la bacteria es normal en un medio común; en cloruro de tetrazolio las colonias presentaron coloración rojiza y amarillo-crema en YDC. Los aislamientos son Gram-positivos y tienen forma de varillas cortas (Cuadro 2).

Los aislamientos bacterianos obtenidos a partir de *Zornia* spp. y de *P. vulgaris* fueron positivos a las pruebas de catalasa y amilasa, negativos a la prueba de oxidasa, no presentaron pigmento fluorescente en el medio B de King, son organismos estrictamente aeróbicos, y produjeron ácido a partir de ramnosa (Cuadro 2).

Las características de los aislamientos bacterianos de *Zornia* ssp se compararon con otros géneros fitopatogénicos (Cuadro 3) y algunas especies (Cuadro 4) del género *Corynebacterium* (Dye y Kemp, 4), confirmando que el agente causal de la enfermedad en *Zornia* spp es *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows.

3.2. Estudios de invernadero.

3.2.1. Prueba de patogenicidad.

Los aislamientos I 603, I 607 e I 614 de *Zornia* spp. y el aislamiento I 615 de *P. vulgaris*, inoculados en tres especies de *Zornia* y siete variedades de fríjol, fueron patogénicos y produjeron clorosis, atrofia y marchitamiento. Los síntomas aparecieron entre 6-12 días en fríjol y en *Zornia* entre 14-17 días después de la inoculación, confirmando que la manifestación de los síntomas varía con el cultivar (Hulluka, 5).

Hubo efecto significativo de la enfermedad en los cultivares inoculados (Cuadro 5). Los testigos mostraron leves síntomas, debido a la cercanía del foco de infección.

Cuadro 1

Características morfológicas en agar nutriente de cuatro aislamientos de *Corynebacterium flaccumfaciens* obtenidos de *Zornia* spp y *Phaseolus vulgaris*

Características	<i>Zornia glabra</i> CIAT 7847			<i>P. vulgaris</i>
	I 603	I 607	I 614	I 615
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular
Color	Crema con halo brillante	Crema con halo brillante	Crema con halo brillante	Crema con halo brillante
Elevación	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
Margen	Entero	Entero	Entero	Entero
Consistencia	Butirosa	Butirosa	Butirosa	Butirosa

Cuadro 2

Características fisiológicas y bioquímicas de cuatro aislamientos de *Corynebacterium flaccumfaciens* procedentes de *Zornia glabra* CIAT 7847 y *Phaseolus vulgaris*

Características	Z. glabra CIAT 7847			P. vulgaris
	I 603	I 607	I 614	I 615
Crecimiento en medio común	+	+	+	+
Tinción de Gram	+	+	+	+
Coloración crema a amarilla en AN*, YDC*.	+	+	+	+
Pigmento fluorescente en K B *	-	-	-	-
Crecimiento anaeróbico	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+
Hidrólisis de almidón de papa	+	+	+	+
Producción de ácido a partir de r amnosa	+	+	+	+

*AN = Agar nutriente. YDC = Levadura, dextrosa, carbonato de calcio, agar.

KB = Medio B de King.

Cuadro 3

Características utilizadas para diferenciar géneros entre bacterias fitopatógenas*

Caracteres	Pseudomonas	Agrobacterium	Erwinia	Xanthomonas	Corynebacterium	Aislamiento de	
						Zornia spp.	P. vulgaris
Crecimiento en medio común	+	+	+	+	+	+	+
Tinción de Gram	-	-	-	-	+	+	+
Coloración crema a amarilla en AN, YDC	-	-	v ⁻	+	+	+	+
Fluorescencia en K B.	v ⁻	-	-	-	-	-	-
Crecimiento anaeróbico	-	-	+	-	-	-	-

+ = resultados positivos

- = resultados negativos

v = resultados variables

* (SAB, 8)

Cuadro 4

Pruebas fisiológicas y bioquímicas en cuatro especies patógenas de *Corynebacterium* y comparación con los aislamientos procedentes de *Zornia* spp. y *Phaseolus vulgaris**

Características	C. michiganense	C. ilicis	C. fasciens	C. flaccumfaciens	Zornia spp.	P. vulgaris
Movilidad	-	+	-	+	+	+
Oxidasa	-	-(1)	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de almidón de papa	v	-	+	+	+	+
Producción de ácidos: ramnosa	-	+	-	+	+	+

* (Dye, and Kemp, 4).

+ = resultados positivos

- = resultados negativos

v = resultados variables

1 = Mandel et al (1961) reportaron oxidasa positiva.

Cuadro 5

Reacción de siete variedades de frijol y tres ecotipos de *Zornia* spp a *Corynebacterium flaccumfaciens*

Especie	Línea	Zornia glabra CIAT 7847			P. vulgaris	Testigo
		I 603	I 607	I 614	I 615	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	P.I. 136677	4.00 a	3.33 abc	3.66 ab	2.66 bcde	2.33 cdef
<i>P. vulgaris</i>	Bat. 41	1.33 fghi	3.33 abc	2.00 defg	3.66 ab	1.00 ghij
<i>P. vulgaris</i>	Porrrillo sintético	1.66 efg	3.66 ab	3.33 abc	2.66 bcde	2.00 defg
<i>P. vulgaris</i>	ICA Guali	3.66 ab	2.66 bcde	2.00 defg	2.33 cdef	1.66 efgh
<i>P. vulgaris</i>	PI 204600	2.66 bcde	3.00 abcd	2.00 defg	3.33 abc	0.33 ij
<i>P. vulgaris</i>	ICA Pijao	3.00 abcd	3.00 abcd	2.66 bcde	2.00 defg	1.00 ghij
<i>P. vulgaris</i>	PI 165078	2.66 bcde	3.00 abcd	1.33 fghi	2.33 cdef	1.00 ghij
<i>Zornia glabra</i>	CIAT 7847	1.00 ghij	1.66 efgh	1.33 fghi	0.66 hij	0.33 ij
<i>Z. brasiliensis</i>	CIAT 7485	0.33 ij	1.00 ghij	0.66 hij	0.66 hij	0.00 j
<i>Z. latifolia</i>	CIAT 728	1.33 fghi	0.66 hij	0.00 j	0.00 j	0.33 ij
	PROMEDIO	2.13 b	2.53 a	1.93 b	2.03 b	1.05 c

Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

La variedad de *P. vulgaris* más susceptible a *C. flaccumfaciens* fue PI 136677 y, en general, todas las variedades de fríjol fueron igualmente afectadas por los cuatro aislamientos. *Z. glabra* CIAT 7847 fue más susceptible al aislamiento I 607, mientras que *Z. brasiliensis* CIAT 7485 y *Z. latifolia* CIAT 728 mostraron altos niveles de resistencia.

3.2.2. *C. flaccumfaciens* en la semilla.

La testa o cobertura de la semilla de fríjol está formada por una capa externa de células en empalizada compuesta de esclereidas alargadas en sentido radial. Debajo de la capa de células en empalizada hay una epidermis de células pequeñas que contienen cristales. En un corte transversal de la semilla, muy cerca de las capas de esclereidas que forman el hilum, se encontraron masas de células de *C. flaccumfaciens* infectando las células que forman la testa de la semilla.

En estas dos capas de células se hallan los pigmentos que dan el color a la semilla, posiblemente por la posición del patógeno en estas células, *C. flaccumfaciens* var. *violaceum* y *C. flaccumfaciens* var. *aurantiaceum* inducen en la semilla decoloraciones púrpuras y amarillas. Decoloraciones registradas en variedades de fríjol susceptibles y tolerantes al marchitamiento bacteriano (Schuster y Christiansen, 6 y Schuster y Sayre, 7).

3.3. Estudios de campo.

3.3.1. Prueba de patogenicidad.

La inoculación del aislamiento I 603 y de la mezcla de los aislamientos I 603, I 607 e I 614 en tres variedades de *P. vulgaris* y *Z. glabra* CIAT 7847, produjeron clorosis, posteriormente necrosis, atrofia, marchitamiento y muerte descendente de parte o de toda la planta. Síntomas descritos también en *Zornia* spp (Torres, Lenné y Victoria, 9) y fríjol (*Zoume yér* y Thomas, 10). Sin embargo, Hulluka (5) y Schuster y Sayre (7) dicen que inicialmente hay formación de pequeñas manchas blancas o amarillas, mas tarde se desarrollan sobrecrecimientos parecidos a pústulas y lesiones costrosas sobre las hojas.

C. flaccumfaciens fue más patogénica a *Z. glabra* CIAT 784 (Cuadro 7), posiblemente por la presencia de aislamientos patogénicos especializados en esta leguminosa forrajera.

La variedad de fríjol Porrillo Sintético fue relativamente resistente mientras que la variedad PI 136677 fue altamente susceptible a los dos aislamientos.

Cuadro 7

Reacción de tres variedades de frijol y Zornia a *Corynebacterium flaccumfaciens*

Especie	Línea	Mezcla de I 603		
		I 603	I 607, I 614	Testigo
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PI 136677	3.22 ^{bc}	3.45 ^{bc}	1.17 ^f
<i>P. vulgaris</i>	PI 204600	2.72 ^d	2.97 ^{cd}	1.82 ^e
<i>P. vulgaris</i>	Porrillo sintético	1.20 ^f	1.90 ^e	0.45 ^g
<i>Zornia</i> spp.	CIAT 7847	4.10 ^a	3.62 ^b	1.87 ^e
	PROMEDIO	2.81 ^a	2.98 ^a	1.33 ^b

Los promedios seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Posiblemente la tolerancia o susceptibilidad de los hospedantes se deba a diferentes factores ambientales como altas temperaturas, condiciones de sequía, que pueden haber alterado la virulencia de la bacteria o susceptibilidad de PI 136677, variedad resistente en Estados Unidos, y que bajo condiciones de Santander de Quilichao fue susceptible a los aislamientos de *Zornia* spp. Por tanto, variedades resistentes en una región en otras podrían no ser tolerantes a *C. flaccumfaciens*.

3.3.2. Incidencia de *C. flaccumfaciens* en la producción de materia seca.

El efecto del marchitamiento bacteriano sobre el rendimiento en peso seco de *Zornia* (Cuadro 8) fue drástico, siendo las pérdidas altamente significativas (81.4 y 75.4 o/o comparadas con el testigo).

En fríjol se registraron pérdidas significativas. En la variedad PI 136677 inoculada con el aislamiento I 603 las pérdidas fueron del 41.17 o/o y del 37.1 o/o cuando se inoculó la variedad Porrillo Sintético con la mezcla de los aislamientos.

La presencia de agentes bacterianos en los vasos xilemáticos, limita severamente el contenido de nutrientes, de agua y la expansión foliar, manifestándose en una reducción de materia seca. Además, el síntoma de manchas parduzcas leves; que sólo se observó en la variedad Porrillo Sintético, pudo ser el indicio de diferencias en la relación hospedante-patógeno, lo cual posiblemente causó pérdidas significativas en su producción.

3.3.3. Efecto de *C. flaccumfaciens* en la infección y germinación de semillas.

Z. glabra CIAT 7847 presentó el nivel más alto de transmisión del patógeno en la semilla (88 o/o) siendo significativamente mayor al de las variedades de fríjol. En fríjol las variedades PI 136677 y PI 204600 presentaron niveles hasta del 51.4 y 52.5 o/o de la semilla infectada, respectivamente (Cuadro 9).

Hubo efecto significativo del patógeno en la semilla, presentando *Z. glabra* CIAT 7847 el más bajo porcentaje de germinación.

El coeficiente de correlación entre el porcentaje de infección bacteriana en la semilla y la germinación (-0.87), indica el efecto del patógeno sobre la germinación de la semilla.

Cuadro 8

Efecto del marchitamiento bacteriano en el rendimiento de materia seca (g/parcela) de tres variedades de frijol y *Zornia glabra* CIAT 7847

Especie	Línea	Mezcla de I 603,		
		I 603	I 607, I 614	Testigo
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PI 136677	24.575	27.625	41.775
<i>P. vulgaris</i>	PI 204600	23.75	26.075	28.75
<i>P. vulgaris</i>	Porrillo sintético	53.675	45.00	71.625
<i>Zornia</i> spp.	CIAT 7847	464.40	349.80	1889.25

Cuadro 9

Porcentaje de germinación in vitro, transmisión por semilla de *Corynebacterium flaccumfaciens* en tres variedades de frijón y Zornia

C e p a	Phaseolus vulgaris						Zornia glabra	
	PI 136677		PI 204600		Porrillo sintético		CIAT 7847	
	Germinación o/o	Semilla Infectada o/o	Germinación o/o	Semilla Infectada o/o	Germinación o/o	Semilla Infectada o/o	Germinación o/o	Semilla Infectada o/o
I 603	88.27 ^{ab}	51.40 ^b	81.25 ^{bc}	52.50 ^b	90.00 ^{ab}	42.50 ^{bc}	50.75 ^d	88.37 ^a
Mezcla de I 603, I 607, I 614	70.65 ^c	43.07 ^{bc}	71.65 ^c	32.50 ^c	90.00 ^{ab}	39.30 ^{bc}	46.75 ^d	88.80 ^a
Testigo	96.10 ^a	13.25 ^d	96.25 ^a	10.00 ^d	97.50 ^a	10.00 ^d	74.00 ^c	45.50 ^{bc}
Promedio	84.52 ^b	35.9 ^b	82.62 ^b	31.66 ^b	92.39 ^a	30.62 ^b	56.42 ^c	74.25 ^a

Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

4. CONCLUSIONES

- 4.1. Con base en la prueba de caracterización y por comparación con el aislamiento I 615 de *P. vulgaris*, se confirmó que el organismo aislado de *Zornia* spp. y causante del marchitamiento bacteriano pertenece a la especie *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows.
- 4.2. Los aislamientos obtenidos de plantas afectadas de *Zornia* spp. fueron patógenos y causantes de la enfermedad en *Zornia* y frijol; el aislamiento I 615 de *P. vulgaris* fue patogénico y causante del marchitamiento bacteriano en *Zornia* y frijol en invernadero y campo.
- 4.3. *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows se transmite en las células de empalizada que forman la testa de la semilla.
- 4.4. En *P. vulgaris* y *Z. glabra* la infección de la semilla alcanzó niveles del 52.5 y 88.8 o/o, respectivamente.
- 4.5. *C. flaccumfaciens* se constituye en un serio problema potencial para los cultivares de frijol y leguminosas forrajeras tropicales en América.

5. BIBLIOGRAFIA

1. BROWN, J. H. and BREEN, L. Brown and Breen method for Gram-positive and Gram-negative bacteria. In: LUNA, L.G. (ed). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Division. McGraw-Hill, 1968. pp. 222-223.
2. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Programa de Pastos Tropicales. Informe anual, 1982. Cali, Colombia
3. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Programa de Pastos Tropicales. Informe anual, 1983. Cali, Colombia.
4. DYE, D. W. and KEMP, W. J. A taxonomic study of plant pathogenic *Corynebacterium* species. New Zealand Journal Agricultural Research 20 : 563-582. 1977.
5. HULLUKA, M. Population trends of three varieties of bean wilt bacterium (*Corynebacterium flaccumfaciens*) in three bean cultivars. Ph. D. Thesis. Lincoln, The University of Nebraska, 1972.
6. SCHUSTER, M. L. and CHRISTIANSEN, D. W. An orange-colored strain of *Corynebacterium flaccumfaciens* causing bean wilt. Phytopathology. 12: 199-221. 1974.

7. SCHUSTER, M. L. and SAYRE, R. M. A *Corynebacterium* induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other leguminosae. *Phytopathology*. 57: 1064- 1066. 1967.
8. SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGIST. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul, Minnessota, 1980.
9. TORRES, C. ; LENNE, J. M.; VICTORIA, J. I. Bacterial wilt of *Zornia* spp. caused by *Corynebacterium flaccumfaciens*. *Int. Conf. Plan Path. Bact.* 5 th, Cali, Colombia, 1981. Proc. pp. 74-79.
10. ZAUMEYER, W. J. and THOMAS, H. R. Bean diseases; how to control them. U. S. Department of Agriculture, 1962. 39 p. (Agriculture Handbook n. 225).